Aus dem Pharmakologischen Institut der
Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN GEHALT AN OXYDIERTEM UND REDUZIERTEM DIPHOSPHOPYRIDINNUCLEOTID (NICOTINSÄUREAMID-ADENIN-DINUCLEOTID) IN VERSCHIEDENEN ZELLFRAKTIONEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Rainer Hoehne
aus Hamburg

1966

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität
Berlin

Direktor: Professor Dr.med. Hans H e r k e n

Untersuchungen über den Gehalt an oxydiertem und reduziertem Diphosphopyridinnucleotid (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid) in verschiedenen Zellfraktionen

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Rainer Hoehne
aus Hamburg

Dekan: Professor Dr. med. Alfred N. W i t t

Referent: Professor Dr. med. Hans H e r k e n

Korreferent: Priv.Doz.Dr. med. Martin K r a m e r

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 2. November 1966

A. E i n l e i t u n g

B. M e t h o d i k

1. Aufbereitung der Zellfraktionen
2. Proteinbestimmung
3. Extraktion und Bestimmung des DPN^+
4. Extraktion und Bestimmung des $DPNH + H^+$
5. Diskussion der Methodik

C. Ergebnisse und Diskussion

1. DPN^+- und $DPNH+H^+$-Gehalt unter Normalbedingungen
2. Einfluß einer Ischämie auf den DPN-Gehalt
3. Einfluß einiger Pharmaka auf den DPN-Gehalt
   a) Einfluß von Stickstoff-Lost in vivo
   b) Einfluß von Tetrachlorkohlenstoff in vivo
   c) Einfluß von Nicotinamid in vivo
   d) Untersuchungen nach mehrfacher Gabe von Nicotinamid
   e) Versuche mit einer Kombination von Nicotinamid und Reserpin
   f) Versuche, den Anstieg des DPN-Gehaltes nach Gabe von Nicotinamid durch 6-Aminonicotinamid zu beeinflussen

Folgende Abkürzungen wurden benutzt:

DPN	= gesamtes Diphosphopyridinnucleotid
DPN^+	= oxydiertes Diphosphopyridinnucleotid
$DPNH+H^+$	= reduziertes Diphosphopyridinnucleotid
EDTA	= Aethylendiamintetraacetat
ADH	= Alkoholdehydrogenase
LDH	= Lactatdehydrogenase

A. Einleitung.

Eine Reihe wichtiger enzymatischer Oxydationen im Intermediärstoffwechsel benötigt Pyridinnucleotide als Co-Faktoren. Verminderungen im Gehalt derartiger Pyridinnucleotide wurden bei vielen pathologischen Zuständen und experimentellen Schädigungen nachgewiesen und teilweise auch als Ursache der Wirkungen bestimmter Pharmaka diskutiert. Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem DPN. Bei den bisherigen Arbeiten wurden häufig entweder nur die oxydierte Form des DPN allein ohne Berücksichtigung etwaiger Änderungen des Redoxzustandes untersucht oder aber der DPN-Gehalt nicht in den einzelnen Zellfraktionen getrennt erforscht, wobei ein möglicher Austausch innerhalb der Fraktionen außer Acht gelassen wurde.

Dem Redox-Quotienten wurde allerdings kein zu hoher Wert beigelegt, da natürlich Veränderungen während der Aufarbeitung, die ca. 2 Stunden dauert, möglich sind. Die oxydierte und die reduzierte Form wurden aber vor allem deswegen beide bestimmt, da die Summe der Pyridinnucleotide sonst nicht zu erfassen ist.

Neben der Erläuterung einer neu en Methode zur Bestimmung des $DPNH+H^+$ in den verschiedenen Fraktionen der Rattenleberzelle unter Normalbedingungen wird in dieser Arbeit der DPN-Gehalt bei Ischämie und nach Behandlung der Ratten mit Nicotinamid, Stickstoff-Lost, Tetrachlorkohlenstoff, 6-Amino-Nicotinamid und Reserpin beschrieben und der Versuch einer Erklärung der dabei auftretenden Erscheinungen gegeben.

B. Methodik.

Versuchstiere: Verwendet wurden 120 - 250 g schwere männliche und weibliche Sprague-Dawley- oder Wistar-Ratten.
Fütterung: Wasser und Standard-Futter (Altromin-R) ad libitum.

1. Aufbereitung der Zellfraktionen.

Die Methode der Darstellung der Zellfraktionen stellt eine Modifikation der Angaben von Schneider und Hogeboom (18) dar. Die bei 3 - 5° C Raumtemperatur dekapitierten Ratten wurden ausgeblutet, die Leber sofort entnommen und in einem Plexiglas-Potter-Elvehjem-Homogenisator mit eiskalter o,25 M Saccharose-Lösung mit o,5 mM EDTA und 10mM Nicotinamid homogenisiert. Es wurden 1 - 3 Lebern mit genau der 4-fachen Menge Saccharose-Lösung aufgearbeitet. Es wurde darauf geachtet, daß die Temperatur 4° C nicht überstieg. In einer Phywe-Kühlzentrifuge wurden in einem ersten Arbeitsgang bei etwa 1000 x g (10 min. lang) die Kerne abzentrifugiert. Im Satz befindet sich neben den Kernen noch ein kleiner Teil intakt gebliebener Leberzellen sowie Bindegewebe, Blutzellen und eventuell agglutinierte Mikrosomen und Mitochondrien. Der Überstand wurde nun bei 7000 - 9000 x g (10 min. lang) zentrifugiert; der hierbei anfallende Bodensatz besteht hauptsächlich aus Mitochondrien, der Überstand ("supernatant") aus Hyaloplasma und Mikrosomen (im Homogenisationsmedium).

Um die Mitochondrienfraktion völlig von Mikrosomenresten zu befreien, wurden die Mitochondrien nach Abgießen des Überstandes mit der beschriebenen Saccharose-Lösung wieder aufgenommen und erneut bei 7000 - 9000 x g (10 min. lang) zentrifugiert. Je nach gewünschtem Reinheitsgrad kann diese "Waschprozedur" mehrere Male wiederholt werden. Für die hier vorgelegten Ergebnisse erwiesen sich ein- und zweimaliges Waschen als ausreichend.

Die als Plasma bezeichnete Fraktion entspricht dem "supernatant" (Mikrosomen im Hyalopla sma), als Homogenat wird das dem Homogenisator direkt entnommene Gemisch von intakten Leber, Bindegewebs- und Blutzellen sowie Mitochondrien, Blutplasma, Leberplasma, Mikrosomen etc. bezeichnet.

In einer Anzahl von Vorversuchen wurde der Anteil der Mikrosomen in der "supernatant"-Fraktion bestimmt. Die Mikrosomen machen ca. 43 % im Proteingehalt des "supernatant" aus. (s. Tab. I).

2. Proteinbestimmung.

Angewendet wurde die Biuretmethode. 1 ml der auf ihren Proteingehalt zu untersuchenden Flüssigkeit wird in 10 ml einer 10 % NaOH gelöst und kann Stunden oder Tage im Kühlschrank stehengelassen werden. Der Ansatz besteht aus:

2,o ml der alkalischen Proteinsuspension
5,o ml einer 10 % NaOH
o,4 ml einer 4 % Cholatlösung (Dehydrocholsäure)
o,6 ml einer 1 % $CuSO_4$-Lösung

Die Extinktion bei der Wellenlänge 540 mμ wurde genau 5 min. nach Zugabe der $CuSO_4$-Lösung gemessen. Als Standard diente Rinder-Serumalbumin. Der Wert wird korrigiert durch einen Leerwert, in dem nur die Extinktion der Reagentien gemessen wird, und durch einen Trübungswert, bei dem, ohne $CuSO_4$, die bloße Trübung der Lösung, die z.B. durch Fett hervorgerufen werden kann, bestimmt wird.

3. Extraktion und Bestimmung des DPN^+.

Die Methode von Klingenberg (17) wurde folgendermaßen modifiziert. 5 ml der eiskalten Flüssigkeit, die auf ihren Gehalt an oxydiertem DPN^+ untersucht werden soll (Mitochondriensuspension, Plasma, Homogenat), werden bei Zimmertemperatur mit 1 ml 3 N $HClO_4$ kräftig umgeschüttelt. Das ausgefallene Protein wird bei 3000 xg bei Zimmertemperatur abzentrifugiert. Das Protein fällt bei dieser Behandlung praktisch vollständig aus. Zu dem durchsichtigen,

leicht gelblichen Überstand wird 1 ml einer 1 M K_2HPO_4-Lösung als Puffer und zur Ausfällung der ClO_4-Ionen pipettiert. Zur Neutralisation werden, je nach Pufferkapazität der Mitochondrien, des Plasmas oder des Homogenats, o,7 - 1,o ml 3 n KOH zugesetzt, so daß ein p_H-Wert von 7,2 - 7,4 erreicht wird. Nach der Neutralisation wird die Lösung wieder in das Eisbad gegeben. Unter diesen Bedingungen ist DPN^+ relativ stabil (22). Die vor der Neutralisation noch vorhandenen Perchlorat-Ionen werden durch die K^+ - Ionen vollständig ausgefällt. Das Eisbad beschleunigt diesen Vorgang und kompensiert die bei der Neutralisation entstehende Reaktionswärme. Nach 15 - 20 min. kann die optische Messung beginnen.

Optischer Test nach O. Warburg.

Zur optischen Messung von DPN^+ wurde die enzymatische Reaktion

$$\text{Aethanol} + DPN^+ \xrightleftharpoons{ADH} \text{Acetaldehyd} + DPNH+H^+$$

benutzt. Bestimmt wird der Extinktionszuwachs bei 340 mμ. Das Gleichgewicht der oben aufgeführten Reaktionsgleichung liegt bei dem hier eingestellten p_H-Wert von 7,2 - 7,4 auf der Seite des Alkohols. Die vollständige Reduktion des DPN^+ zu $DPNH+H^+$ läßt sich daher nur durch Entfernung des gebildeten Acetaldehyds erreichen. Dies geschah durch Zusatz von Semicarbazid. Die Extinktionsveränderungen wurden mit einem selbstschreibenden Beckman-Spektrophotometer DK 2 registriert. Verwendet wurden Quarzcuvetten von 1 cm Schichtdicke. Die Vergleichscuvette enthielt Wasser, die Meßcuvette folgenden Ansatz:

2,o ml des neutralisierten Extraktes
1,o ml einer Natriumpyrophosphatpuffer-Semicarbazid-Lösung (4,5 g $Na_4P_2O_7$ x 10 H_2O + o,5 g Semicarbazid-HCL mit aqua dest. ad 100 ml)
o,2 ml absol. Aethylalkohol

Tabelle I

Aufschlüsselung des "supernatant" der 7000 x g Zentrifugation in Hyaloplasma und Mikrosomen nach ihrem Proteingehalt. Prozentualer Anteil der Mikrosomen am "supernatant".
Werte nach der Biuret-Methode in mg Protein/ml.

Mikrosomen	Hyaloplasma	"supernatant"	Mikrosomen in % vom Hyaloplasma
11,8	14,5	26,5	45 %
14,4	2o,5		41 %
15,o	2o,5		42 %

Die mit diesem Ansatz in der Cuvette gemessene Extinktion bei der Wellenlänge 340 mμ galt als Ausgangslinie. Zum Ablauf der Reaktion wurden in die Meßcuvette o,o2 - o,o5 ml einer 1 : 10 verdünnten Alkoholdehydrogenase-Kristallsuspension aus Hefe (Boehringer, spez. Aktivität 180 E/mg) gegeben.

Der mmolare Extinktionskoeffizient des $DPNH+H^+$ bei 1 cm Schichtdicke beträgt 6,2 bei 340 mμ. Die gemessene Extinktionsdifferenz dividiert durch 6,2 ergibt also die mmolare Konzentration an DPN^+.

Als Bezugssystem diente in allen Fällen der Proteingehalt.

4. Extraktion und Bestimmung des $DPNH+H^+$.

Versuche mit der von Klingenberg (17) angegebenen Methode ergaben keine zufriedenstellenden Werte. Der Extrakt wurde nicht ausreichend proteinfrei, so daß einerseits die Möglichkeit besteht, daß enzymatische Reaktionen weiterhin ablaufen, andererseits für optische Messungen viel zu starke Trübungen bestehen bleiben. Dies war besonders bei der Plasma- und Homogenatfraktion der Fall. Die Methode wurde daher wie folgt abgewandelt:

3 ml der Flüssigkeit, die auf ihren Gehalt an reduziertem $DPNH+H^+$ untersucht werden sollte, wurden zu einer alkalischen Lösung gegeben, die aus o,7 ml einer 3 n NaOH mit unmittelbar vorher darin gelösten 120 mg reduziertem Glutathion und 1 ml einer 1 n alkoholischen NaOH besteht, und umgeschüttelt. Zur möglichst vollständigen Durchdringung der sich leicht bildenden Flocken und Klumpen wurde der Ansatz bei Zimmertemperatur 10 min. lang leicht umgeschüttelt, dann 1 ml einer bei Zimmertemperatur gesättigten $(NH_4)_2SO_4$-Lösung unter Umrühren hinzugefügt. Zur Erreichung eines p_H-Wertes von 7,6 - 7,8 wurden 5 ml eines 2 M Tris-HCl-Puffers (p_H 7,1) hinzupipettiert. Das bei gutem Durchmengen flockig anfallende Protein wurde durch mindestens 20 min. dauerndes Zentrifu-

gieren bei 10.000 - 11.000 x g bei +2° C abgesetzt. Der klare gelbliche Überstand wurde dann im Eisbad bis zur optischen Messung aufbewahrt, die möglichst bald durchgeführt werden muß, da sonst das empfindliche $DPNH+H^+$ durch eventuell noch vorhandene Proteinspuren mit enzymatischen Eigenschaften zerstört oder durch oxydierende Substanzen in DPN^+ übergeführt werden und damit der Messung entgehen kann.

Optischer Test nach Warburg.

Zur optischen Messung von $DPNH+H^+$ wurde die Reaktion

$$\text{Pyruvat} + DPNH+H^+ \xrightleftharpoons{LDH} \text{Lactat} + DPN^+$$

benutzt. Bestimmt wurde wiederum die Extinktionsänderung bei der Wellenlänge 340 mμ. Das Reaktionsgleichgewicht liegt bei dem leicht alkalischen p_H-Wert so weit auf der rechten Seite der obigen Gleichung, daß die Reaktion auf jeden Fall zu Ende abläuft. Die Messung entspricht der oben für das DPN^+ angeführten. Die Meßcuvette wurde mit folgendem Ansatz beschickt:

3,0 ml des neutralisierten Extraktes
0,02 ml einer 1 M Natriumpyruvatlösung.

Die mit diesem Ansatz in der Cuvette gemessene Extinktion bei 340 mμ gegen Wasser in der Vergleichscuvette wurde als Ausgangslinie geschrieben, die dem vorher vorhandenen $DPNH+H^+$ entspricht. Zum Ablauf der Reaktion wurden in die Meßcuvette 0,03 - 0,05 ml einer 1:100 verdünnten Lactatdehydrogenase-Kristallsuspension aus Kaninchenmuskel (Boehringer, spez. Aktivität 360 E/mg) gegeben. Das Schreibgerät stellt die ablaufende Reaktion wiederum als Kurve dar, der Endpunkt entspricht der vollständigen Oxydation des $DPNH+H^+$. Die Berechnung geschieht entsprechend derjenigen beim oxydierten DPN^+.

5. Diskussion der Methodik.

Die Aufbereitung der Zellfraktionen kann unter verschiedenen Gesichtspunkten geschehen. Je nach späterem Verwendungszweck, nach Art der Untersuchung, gilt es, entweder eine möglichst hohe Ausbeute in den Einzelfraktionen zu erzielen oder möglichst konzentrierte Suspensionen zu erhalten oder die Fraktionen möglichst schnell zu isolieren oder aber auch sie möglichst rein zu erhalten. Da in dem Homogenat durch Aktivierung von Nucleosidasen aus den Mikrosomen (20) die Pyridinnucleotide leicht gespalten werden können, muß erstens möglichst schnell gearbeitet werden, zweitens aber versucht werden, die Spaltung zu verhindern. Dies geschieht durch den Zusatz von 10 mM Nicotinamid (8). Diese hohe Konzentration ist imstande, die Spaltung zu hemmen. Es kommt also darauf an, das Homogenisationsmedium so schnell wie möglich gleichmäßig im zu untersuchenden Gewebe zu verteilen. Bei der für die Mitochondriengewinnung wesentlich ergiebigeren Methode, die Leber vor dem Homogenisieren durch ein Sieb zu drücken, um größere Zellverbände schon aufzulösen und Bindegewebe zurückzuhalten, ist die gleichmäßig schnelle Verteilung des Nicotinamids innerhalb des Gewebes nicht gewährleistet. Versuche mit derart gewonnenen Fraktionen ergaben für die Mitochondrien Werte innerhalb der normalen Grenzen, für die Plasmafraktion aber liegen sie unter 1 mμmol/mg Protein, sowohl für DPN^+ als auch für $DPNH+H^+$. Es muß daher die Leber sofort nach Herausnahme in toto in das Homogenisationsmedium gebracht werden, damit sie beim sofort anschließend durchgeführten Homogenisieren vollkommen von Nicotinamid umgeben ist.

Die Mitochondrien, die den hier vorgelegten Ergebnissen zugrunde liegen, sind jeweils nur ein- bis zweimal gewaschen. Durch die eventuell noch anhaftenden Plasma- und Mikrosomen-Anteile sind kleine Schwankungen in der Bestimmung des Mitochondrien-DPN-Gehaltes möglicherweise zu erklären. Andererseits aber ist beim

zu häufigen Waschen der Mitochondrien die Gefahr der Schädigung durch mechanische Einflüsse recht groß. Besonders schädigend wirken das dauernde Auf- und Absaugen in der Pipette, und es resultiert durch die längere Dauer der Aufbereitung eine Verschiebung des $DPN^+/DPNH+H^+$-Quotienten sowie die Zerstörung durch eventuell vorhandene Fermente. Dies zeigen die abfallenden Plasmawerte bei mehr als zweimaligem Waschen oder länger als 10 min. dauerndem Zentrifugieren oder längerem Stehenlassen des Homogenats. Die längere Aufbereitungsdauer und ihre Folgen werden unten bei den Ischämieversuchen näher diskutiert werden.

Die Veränderung des Mitochondrien-DPN-Gehalts durch anhaftende Plasmateilchen ist bei der Bestimmung unter normalen Bedingungen bei unvorbehandelten Tieren gering, bei denen die Differenz zwischen DPN-Gehalt in Mitochondrien und Plasma sowieso nicht so erheblich ist. Wesentlich größer kann schon die Veränderung bei den Bestimmungen na ch Injektion von Nicotinamid werden, da die Werte im Plasma ein Vielfaches derer in den Mitochondrien betragen. Verschieden häufige Waschungen der Mitochondrien ergaben jedoch auch bei den Versuchen unter diesen Bedingungen keinen wesentlichen Unterschied im DPN-Gehalt der Mitochondrien.

Die besondere Schwierigkeit der Proteinbestimmung liegt darin, daß lipoproteinhaltige Fragmente aus Mitochondrienmembranen und aus dem endoplasmatischen Retikulum emulgieren und auf diese Weise starke Trübungen verursachen. Dies kann teilweise dadurch vermieden werden, daß die auf ihren Proteingehalt zu untersuchenden Flüssigkeiten eine Zeitlang vor der Proteinbestimmung in alkalischer Lösung aufbewahrt werden. Es kommt dabei zu einer wesentlichen Klärung der Lösung. Eine allzu lange Behandlung des Proteins mit NaOH wurde vermieden, damit es nicht zu einer möglichen Hydrolyse kam.

Versuche mit 0,2 n H_2SO_4 bei der sauren Proteinausfällung ergaben zwar höhere Werte für DPN^+ als bei der Fällung mit Perchlorsäure. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß diese Werte durch Oxydation von $DPNH+H^+$ (wahrscheinlich nichtenzymatisch) hervorgerufen sind. (30). Die von Lowry (16, 22) angegebene Methode hat daher keinen Vorteil gegenüber einer Enteiweißung mit Perchlorsäure.

Die von Klingenberg angegebene Methode der alkalischen Proteinausfällung (17) hat sich in unseren Händen nicht bewährt. Das kurzzeitige Erhitzen im 100° C - Wasserbad und das nachfolgende Abkühlen im Eisbad, das auch von Jacobson und Kaplan (8) angegeben wird, ließ die Lösung in keinem Falle so klar werden, daß eine vollkommene Enteiweißung angenommen werden konnte. Zur Verbesserung der von Klingenberg beschriebenen Fällung durch 0,02 n NaOH wurde Cystein in einer Konzentration von 0,05 M zugesetzt. Es ist aber nur in einem Falle durch langes Stehenlassen und hohes Zentrifugieren (12.000 xg) nach der Neutralisation gelungen, den Extrakt so weit klar zu bekommen, daß er zur optischen Messung geeignet war. Bei einer lang dauernden Aufbereitung besteht die Gefahr einer nichtenzymatischen Oxydation, außerdem aber die vor der endgü ltigen Beseitigung des Proteins immer vorhandene Möglichkeit, daß spaltende oder oxydierende Fermente noch aktiv sind.

Durch Zugabe von reduziertem Glutathion wird der vorzeitigen nichtenzymatischen Oxydation gut entgegengewirkt. Wegen der inneren Ringbildung ist das reduzierte Glutathion gegen Autoxydation stabiler als das Cystein. Außerdem ist im Falle einer Oxydation das oxydierte Glutathion wasserlöslich, fällt also nicht aus und ergibt somit keine Trübung, im Gegensatz zum Cystein, bei dem durch Ausfällung leicht eine die optische Messung störende Trübung auftreten kann. Durch eine Versuchsserie hat sich herausgestellt, daß für 3 ml Flüssigkeit, die auf ihren $DPNH+H^+$-Gehalt untersucht

werden soll, 120 mg reduziertes Glutathion nötig sind, um einen ausreichenden stabilisierenden Effekt zu erzielen. Da sich das reduzierte Glutathion nicht in alkoholischer Lauge löst, wird die Menge der alkoholischen Lauge vermindert, dafür das Glutathion in wässriger Lauge gelöst und mit der alkoholischen Lauge vereinigt.

Klingenberg beschreibt bei der Aufbereitung des Blutes die Zugabe von gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung. Um die Höchstmenge, die ohne Beeinträchtigung der später ablaufenden Fermentreaktion (Pyruvat + $DPNH+H^+ \rightleftharpoons^{LDH}$ Lactat + DPN^+) bei der optischen Messung noch zuträglich ist, zu ermitteln, wurde ein Testversuch mit einer bekannten Menge $DPNH+H^+$ unternommen. Der Test wurde gleichzeitig auf Empfindlichkeit der Fermentreaktion gegen höhere Alkoholkonzentration ausgedehnt. In der Tabelle II sind die dabei gefundenen Ergebnisse zusammengestellt.

Entgegen den von Klingenberg angegebenen Befunden, daß die Reaktion bei 20 % Alkohol und 30 % $(NH_4)_2SO_4$-Sättigung noch gut abläuft, muß aus obiger Tabelle geschlossen werden, daß bei 20 - 30 % Ammoniumsulfat-Sättigung eine Alkoholkonzentration von 15 % nicht überschritten werden darf. Bei den dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuchen wurden jedoch eine Alkohol-Konzentration von 10 % und ei ne $(NH_4)_2SO_4$-Sättigung von 10 % nicht überschritten. Bei der Neutralisation bewährte sich ein 2 M Tris-HCl-Puffer mit einem p_H-Wert von 7,1, da keine so große Menge mit dem Nachteil der hohen Verdünnung gebraucht wird wie bei dem Triaethanolamin-HCl-Phosphat-Puffer nach Klingenberg. Die relativ hohe resultierende Ionenstärke stört die enzymatische Reaktion nicht.

Bei dem 10minütigem Einwirken der Lauge bleiben noch geringe Reste an oxydierten Pyridinnucleotiden zurück (bis zu 25 % des ursprünglich vorhandenen DPN^+). Für die spätere Messung spielen

sie jedoch keine Rolle, da sie die Oxydation des $DPNH+H^+$ nicht hemmen und bei der spektrophotometrischen Messung nicht stören. Dies geht auch daraus hervor, daß bei den um das 10fache erhöhten DPN^+-Werten nach Nicotinamid-Injektion noch normale $DPNH+H^+$-Werte gemessen werden konnten.

Zur Kontrolle der oben beschriebenen Methode wurde einem Ansatz eine definierte $DPNH+H^+$-Menge zugesetzt, die später regelmäßig mit nur einer Fehlerbreite von ca. 10 % wiedergefunden wurde.

Auffallend ist, daß die Oxydation von $DPNH+H^+$ in einem alkalisch aufbereiteten, dann neutral isierten Extrakt ungleich langsamer abläuft als die Oxydation einer gleichen Menge $DPNH+H^+$ in Trispuffer von gleichem p_H-Wert bei gleicher Alkoholkonzentration, Ammoniumsulfat-Sättigung und Fermentmenge. Da aber auch definierte $DPNH+H^+$-Mengen, die dem Extrakt zugesetzt werden, derart langsam reagieren, die Reaktion jedoch quantitativ zu Ende läuft, ist zu schließen, daß trotz der Verzögerung alles vorhandene $DPNH+H^+$ umgesetzt und damit gemessen wird. Unbekannte Hemmstoffe oder die durch die Alkalisierung und nachfolgende Neutralisation erhöhte Ionenstärke mögen die Ursache hierfür sein.

Tabelle II

Prüfung des Reaktionsablaufes der Reaktion
Pyruvat + DPNH+H^+ $\rightleftharpoons^{LDH}$ Lactat + DPN^+
bei verschiedenen Alkoholkonzentrationen und
Ammoniumsulfat-Sättigungsgraden

Alkohol-konzentration	$(NH_4)_2SO_4$-Sättigung	Ferment-menge	Reaktions-ablauf
1o %		normal x)	+++
2o %		normal	++
3o %		10-fach	+
4o %		300-fach	(+)
			-
	1o %	normal	+++
	3o %	10-fach	+
	5o %		-
1o %	1o %	2-fach	++
15 %	2o %	4-fach	++
15 %	3o %	20-fach	+
2o %	2o %		-

x) = 0,01 ml einer 1:100 verdünnten LDH (Boehringer, spez.Aktivität 36o E/mg)

C. Ergebnisse und Diskussion.

1. DPN^+- und $DPNH+H^+$-Gehalt unter Normalbedingungen.

Da die Pyridinnucleotide der Zelle sich hauptsächlich im Hyaloplasma und in den Mitochondrien befinden, in den Kernen und Mikrosomen dagegen nur wenige Prozent der Gesamtmenge der Zelle vorhanden sind (8), wurden vorwiegend Untersuchungen in den Mitochondrien und im "supernatant" angestellt. Der Gesamtgehalt der Zelle wurde im Homogenat der frisch aufbereiteten Leber bestimmt. Der Einfachheit halber wurde zur Bestimmung des DPN-Gehaltes im Hyaloplasma das gesamte "supernatant" verwendet, da der mikrosomale Anteil am DPN ca. 1 - 2 % (7,8) beträgt und somit vernachlässigt werden kann. Berücksichtigt werden muß aber dabei der Proteingehalt der Mikrosomen, der bei unserer Aufbereitungsmethode ca. 43 % des "supernatant"Proteins ausmachte, was mit anderen Untersuchungen gut übereinstimmt (18, 19).

In der Tabelle III sind die Werte aus 8 Versuchen unter den oben beschriebenen Normalbedingungen zusammengestellt.

Aus den Mittelwerten der "supernatant"-Fraktion läßt sich der DPN-Gehalt des Hyaloplasmas errechnen. Der Hyaloplasma-Anteil am "supernatant" beträgt ca. 57 %, der Mikrosomen-Anteil ca. 43 %. In der Annahme, daß in den Mikrosomen kein DPN vorhanden ist, stehen die "supernatant"-Werte für Hyaloplasmawerte, die um 43 % erniedrigt sind. Denn das Protein der Mikrosomen wird im "supernatant" mitgemessen und verändert das Bezugssystem.

Tabelle III

DPN-Gehalt in Mitochondrien und Zellplasma ("supernatant" = Hyaloplasma + Mikrosomen) der Rattenleberzelle. Zusammenstellung von 8 Versuchen unter Normalbedingungen. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert aus 3 Ratten. Die Werte sind angegeben in µmol/mg Protein. Versuchsbedingungen wie im experimentellen Teil angegeben. Nicotinamidkonzentration im Aufbereitungsmedium 10 mM. (Mittelwerte $\pm \sigma$)

M i t o c h o n d r i e n

DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
1,2	1,8	3,o
1,2	1,9	3,1
1,3	2,o	3,3
1,4	2,o	3,4
1,5	2,1	3,6
1,7	2,2	3,9
1,8	1,8	3,6
1,8	2,o	3,8
Mittelwerte 1,5 ± 0,096	2,0 ± 0,055	3,5 ± 0,122

" s u p e r n a t a n t " der 7000 x g Zentrifugation

DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
2,1	1,3	3,4
2,7	1,3	4,o
2,7	1,8	4,5
2,9	1,2	4,1
3,2	1,o	4,2
3,3	1,2	4,5
3,5	1,o	4,5
3,9	o,9	4,8
Mittelwerte 3,0 ± 0,211	1,2 ± 0,139	4,2 ± 0,164

Errechnete Werte für Hyaloplasma:

DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
5,3	2,1	7,4 µmol/mg Prot.

Bestimmt man die prozentualen Anteile der einzelnen Zellfraktionen an der Gesamtzelle nach ihrem Proteingehalt, so findet man die folgende Verteilung (18,19):

1o - 15 % Kern
25 - 3o % Mitochondrien
2o - 3o % Mikrosomen
35 % Hyaloplasma

Knapp zwei Drittel des Zellproteins sind also in der "supernatant"-Fraktion der 7000 x g Zentrifugation, ein Viertel bis ein Drittel in der Mitochondrien-Fraktion enthalten.

Aus diesem Verteilungsverhältnis läßt sich, wie in der Tabelle IV ausführlich dargelegt wird, der DPN-Gesamtgehalt der Zelle mit 3,87 µmol/mg Protein errechnen.

Durch den prozentual kleinen Anteil an DPN in den Mikrosomen und in den Kernen wird dieser Wert auf ca. 4,0 µmol/mg Protein Gesamt-DPN in der Leberzelle angehoben.

Dem entspricht der im Homogenat der ganzen Zelle gemessene DPN-Gehalt von 4,0 µmol/mg Protein. In Tabelle V ist eine Anzahl von Bestimmungen im Homogenat aufgeführt.

Tabelle IV

Berechnung des DPN-Gesamtgehaltes der Zelle aus dem prozentualen Anteil der einzelnen Zellfraktionen an der Gesamtzelle nach ihrem Proteingehalt.
Zugrundegelegt wurde für Hyaloplasma und Mikrosomen zusammen ein DPN-Gehalt von 4,2 mμmol/mg Protein, für Mitochondrien 4,5 mμmol/mg Protein. (Es stellte sich heraus, daß der tatsächliche DPN-Gehalt der Mitochondrien nicht 3,5, sondern 4,5 mμmol/mg Protein beträgt. Ausführliche Erläuterungen s.u.).

3o % der Zelle enthalten 4,5 mμmol/mg Protein (Mitochondrien)	1,35 mμmol/mg Protein
6o % der Zelle enthalten 4,2 mμmol/mg Protein (Hyaloplasma + Mikrosomen)	2,52 mμmol/mg Protein
1o % der Zelle enthalten Spuren (Kerne)	
100 % (Gesamtzelle) enthalten	3,87 mμmol/mg Protein

Tabelle V

DPN-Gehalt im Homogenat der Rattenleber.
Zusammenstellung von 5 Versuchen unter Normalbedingungen.
Jeder Wert repräsentiert das Leberhomogenat von einer Ratte.
Die Werte sind angegeben in mmol/mg Protein.
Versuchsbedingungen wie im experimentellen Teil angegeben.
Nicotinamidkonzentration im Aufbereitungsmedium 10 mM.

Homogenat

	DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
	2,6	1,o	3,6
	2,8	1,5	4,3
	3,2	1,o	4,2
	3,o	1,3	4,3
	2,5	1,2	3,7
Mittel-werte	2,8 $\pm$ 0,145	1,2 $\pm$ 0,106	4,0 $\pm$ 0,173

Im Vergleich hierzu sind in der nachstehenden Tabelle VI die von anderen Autoren angegebenen Werte für den DPN-Gehalt der Leberzelle bezw. der einzelnen Zellfraktionen zusammengestellt. Als Umrechnungsfaktor von Leberfrischgewicht auf Trockengewicht wurde das von Anfinsen (2) und Borst (15) beschriebene Verteilungsverhältnis in der Leberzelle benutzt, die einen Wassergehalt von 70 % angeben. Der Proteingehalt der Trockenbestandteile der Zelle wird von Birt und Bartley (12) mit 66 % angegeben. Daraus ergibt sich ein Proteingehalt der frischen Leber von 20 %. Für die Umrechnung von µg DPN in mµmol DPN wurde das mittlere Molekulargewicht des DPN von 664,5 benutzt.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Werte entsprechen beim Homogenat ziemlich genau den höheren der in der Tabelle aufgeführten Werte; beim Hyaloplasma liegen sie deutlich höher, und zwar ist der Unterschied am auffallendsten beim $DPNH+H^+$. Der Grund hierfür ist nicht leicht zu klären. Es kann natürlich an der Aufbereitungsmethode liegen, die, wie oben ausführlich erläutert, Schwierigkeiten in sich birgt, besonders bei der vorsichtigen alkalischen Fällung des Proteins und der Stabilisierung des $DPNH+H^+$. Es kann aber auch an einer Verschiebung des $DPN^+/DPNH+H^+$-Quotienten liegen, wobei dann allerdings nicht alles DPN^+ erfaßt sein kann. Schließlich gibt es noch die Theorie des "extra"-DPN^+ von Purvis (11), das bei einer Methode vielleicht mitbestimmt worden ist, bei einer anderen nur teilweise oder gar nicht.

Die von Neuhoff und Mitarb. veröffentlichten Werte für den DPN-Gehalt der Gesamtzelle liegen etwas höher als die hier angegebenen. Der Grund für diese Diskrepanz ist zur Zeit noch nicht klar.

Tabelle VI

Zusammenstellung der DPN^+- und $DPNH+H^+$-Werte der Rattenleberzelle und ihrer Fraktionen aus der Literatur. Werte aus den verschiedenen Maßsystemen der Autoren umgerechnet in µmol/mg Protein. x)

Autor		Gesamtzelle bezw. Homogenat			Hyaloplasma			Mitochondrien		
		DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe	DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe	DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
f	(1)			7,5						
en	(2)			3,27						
kens + al.	(3)			3,6						
ich + al.	(4)	2,4	1,o	3,4						
+ McLean	(5)	2,75	1,5	4,25						
in + al.	(6)	2,8	2,35	5,15						
+ McLean	(7)	3,2	o,87	4,o5	2,7	o,37	3,o7	o,36	o,16	o,41
on + al.	(8)	3,3	o,75	4,o5	2,5	o,25	2,75	o,6	1,4	2,o
		3,15	1,15	4,3						
+ al.	(9)			2,6						
n + al.	(9a)	2,4	1,5	3,9						
nberg + al	(10)									1,2 - 2,7
	(11)							1,4	1,6	3,o
Bartley	(12)							3,o	o,7	3,7
+ al.	(13)									
ffentlichte Werte seiner Mitarbeiter				Bouman				1,4	2,7	4,1
				Winter				1,4	2,3	3,7
				Bailie				1,7	2,4	4,1
+ al.	(31)	2,5	o,6	3,1						
nberg	(14)									3,2
	(15)			4,35						1,9 - 4,2
ard + al.	(32)			4,5						
aum + al.	(33)	4,o	1,1	5,1						
-Bunuel + al.	(39)	4,32	o,69	5,o1						
f + al.	(4o)	4,21	o,55	4,76						
Arbeit		2,8	1,2	4,o	3,o	1,2	4,2	1,4	3,1	4,5

µmol DPN/mg Protein = 40 µg DPN/g Trockengewicht
33 µg DPN/g Feuchtgewicht

Allerdings muß hier ein sehr auffallender Befund angeführt werden. Wie oben schon ausführlich dargestellt wurde, muß für die Aufbereitung und Stabilisierung des DPN^+ und des $DPNH+H^+$ im Homogenat und im "supernatant" die Nicotinamid-Konzentration im Homogenisationsmedi um mindestens 10 mM betragen, um der spaltenden Wirkung von Nucleosidasen entgegenzutreten, die bei der Zerstörung der Zellmembran aktiviert zu werden scheinen. Hilz erklärt dies mit einer ausreichend hohen Nicotinamid-Konzentration innerhalb der Zelle, solange ihre Struktur vollständig erhalten ist (20). Nun hat sich aber herausgestellt, daß diese verhältnismäßig hohe Konzentration von Nicotinamid auf den DPN-Gehalt der Mitochondrien eine vermindernde Wirkung hat. Verwendet man bei der Aufbereitung nur eine Nicotinamid-Konzentration von 1 mM im Medium, so ergeben sich deutlich höhere DPN-Werte in den Mitochondrien. Eine Reihe von 10 Versuchen ist in der Tabelle VII zusammengestellt. Während das DPN^+ kaum verändert ist, ergibt sich eine deutliche Steigerung des $DPNH+H^+$. Hieraus resultiert eine starke Verschiebung des Redox-Quotienten zugunsten des $DPNH+H^+$. Zum besseren Vergleich sind in der Tabelle VII noch einma l die Mittelwerte aus den Versuchen aufgeführt, die mit der höheren Nicotinamid-Konzentration von 10 mM durchgeführt wurden.

Wie schon erwähnt, sinken die DPN^+- und $DPNH+H^+$-Werte im "supernatant" bei der niedrigeren Nicotinamid-Konzentration rapide ab. Daß auch das reduzierte $DPNH+H^+$ dabei mit abfällt, ist wohl aus einem gewissen Austausch und einer Wechselwirkung im Redoxsystem zu erklären (Jedeikin (6), Klingenberg (10) und Borst (15)). Je nach angetroffenem Zerstörungszustand schwanken dann die Werte innerhalb größerer Grenzen. In Tabelle VIII ist eine Reihe von 8 Versuchen zusammengestellt, bei denen der DPN-Gehalt im "supernatant" bei der niedrigen Nicotinamid-Konzentration untersucht wurde.

Tabelle VII

DPN-Gehalt in Mitochondrien der Rattenleberzelle.
Zusammenstellung von 10 Versuchen unter Normalbedingungen.
Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert aus 3 Ratten.
Die Werte sind angegeben in mμmol/mg Protein.
Versuchsbedingungen wie im experimentellen Teil angegeben.
Nicotinamidkonzentration im Aufbereitungsmedium 1 mM.
Mittelwerte ± σ

	Mitochondrien	
DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
1,6	2,5	4,1
1,o	3,4	4,4
1,8	3,2	5,o
1,4	2,o	3,4
1,4	3,7	5,1
1,4	4,o	5,4
1,o	4,1	5,1
1,1	3,2	4,3
1,5	3,4	4,9
1,4	2,o	3,4
Mittelwerte 1,4 ± 0,088	3,1 ± 0,25	4,5 ± 0,24

Im Vergleich hierzu die Mittelwerte des DPN-Gehaltes in den Mitochondrien aus 8 Versuchen, die mit einer Nicotinamidkonzentration von 10 mM im Aufbereitungsmedium gewonnen wurden.

Mittelwerte 1,5 ± 0,096	2,0 ± 0,055	3,5 ± 0,122

Tabelle VIII

DPN-Gehalt im "supernatant" der 7000 x g Zentrifugation der Ratten-leberzelle.
Zusammenstellung von 8 Versuchen unter Normalbedingungen.
Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert aus 3 Ratten.
Die Werte sind angegeben in m mol/mg Protein.
Versuchsbedingungen wie im experimentellen Teil angegeben.
Nicotinamidkonzentration im Aufbereitungsmedium 1 mM.

" s u p e r n a t a n t "

	DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
	o,3	0	o,3
	o,2	o,9	1,1
	o,3	1,o	1,3
	o,3	o,4	o,7
	o,1	o,4	o,5
	o,1	o,5	o,6
	o,2	o,3	o,5
	o,4	1,o	1,4
Mittel-werte	o,2 ± o,o43	o,6 ± 0,14	o,8 ± o,16

Im Vergleich hierzu die Mittelwerte des DPN-Gehaltes aus dem "supernatant" der 7000 g Zentrifugation aus 8 Versuchen, die mit ei ner Nicotinamidkonzentration von 10 mM im Aufbereitungs-medium gewonnen wurde.

Mittel-werte	3,o ± o,211	1,2 ± o,139	4,2 ± o,164

Zum Vergleich sind auch hier noch einmal die Mittelwerte aus den Versuchen aufgeführt, die mit der höheren Nicotinamid-Konzentration von 10 mM durchgeführt wurden.

Aus diesen Versuchen geht deutlich hervor, daß für die Bestimmung des DPN-Gehaltes in den einzelnen Zellfraktionen verschiedene Nicotinamid-konzentrationen optimal sind. Bei der gleichzeitigen Untersuchung der einzelnen Fraktionen innerhalb eines Versuchsguts ist dies technisch aber nicht möglich. Man ist also immer gezwungen, einen Kompromiß zu machen, entweder können die Untersuchungen nur nacheinander durchgeführt werden, oder es muß auf den optimalen Wert bei einer Fraktion verzichtet werden.

Es wurde oben schon auf eine Verschiebung des Redox-Quotienten hingewiesen. Dazu ist noch einiges zu sagen. Die in den isolierten Zellfraktionen gefundenen Redoxquotienten spiegeln nicht unbedingt die Verhältnisse wieder, die in dem Organ zur Zeit des Todes vorgelegen haben. Der Bestimmung der Redoxquotienten wird deshalb im Rahmen dieser Arbeit auch kein großer Wert beigemessen. Die Bestimmung des oxydierten und des reduzierten Anteils der Pyridinnucleotide sollte zunächst nur die Beurteilung des gesamten DPN-Gehaltes in der Zellfraktion erlauben. Bei den Befunden einer ganzen Reihe von Untersuchern wurden nämlich nur die oxydierten Anteile der Pyridinnucleotide ausgewertet. Dies ka nn selbstverständlich nur ein recht unvollständiges Bild ergeben.

Bei der Isolierung der Zellfraktionen kommt es leicht zu Verschiebungen der Redoxquotienten der Pyridinnucleotide. Dies zeigt ein einfacher Versuch: Die Lebern einiger Ratten, wurden sogleich nach dem Töten in ü blicher Weise aufgearbeitet und die erhaltenen Werte mit entsprechenden Daten verglichen, die an Organen gewonnen

wurden, die nach dem Tode der Tiere noch einige Minuten im Kühlraum liegengelassen wurden und erst dann homogenisiert wurden. Es zeigte sich, daß durch ein solches Vorgehen der Gesamtgehalt an DPN nicht meßbar verändert wurde. Hingegen war eine deutliche Verschiebung des Redoxquotienten zugunsten von $DPNH+H^+$ zu erkennen. Jedeikin (6) spricht in diesem Zusammenhang von einer "tissue-anaerobiosis", bei der DPN^+ in $DPNH+H^+$ umgewandelt wird.

2. Einfluß einer Ischämie auf den DPN-Gehalt.

Veränderungen der Durchblutung eines Organs kommt bei pharmakologischen Versuchen eine wesentliche Bedeutung zu, da nach der Applikation eines Pharmakons häufig mit einer Veränderung des Blutdruckes oder der Durchblutung eines Organs gerechnet werden muß. Es war daher von Interesse zu untersuchen, wie schnell ein Organ nach dem Einsetzen einer Ischämie mit einer Veränderung des DPN-Gehaltes reagiert. Die beschriebenen orientierenden Untersuchungen legten den Schluß nahe, daß die Pyridinnucleotide in der intakten Zelle (vor dem Homogenisieren) relativ stabil sind.

Es wurden systematische Untersuchungen durchgeführt, bei denen die Lebern sogleich nach dem Tode des Tieres entnommen wurden und für verschiedene Zeiten im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C in einer feuchten Kammer aufgehoben wurden. Danach erfolgte die Homogenisierung in einem Medium mit 10 mM Nicotinamidkonzentration und die Isolierung der Zellfraktionen sowie die Bestimmung von DPN^+ und $DPNH+H^+$ in der beschriebenen Weise. Die gefundenen Werte sind in Tabelle IX zusammengestellt.

Es ist beachtenswert, daß bis zu einem Zeitraum von 2 Stunden nach Einsetzen der kompletten Ischämie kein wesentlicher Abfall des Gesamt-DPN-Gehaltes zu beobachten ist. Dieser Befund paßt zu

Tabelle IX

Ischämie bei 37° C, Rattenleber im Brutschrank.
DPN-Gehalt in Mitochondrien und im "supernatant".
Zusammenstellung von Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten unter Normalbedingungen.
Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert von 3 Ratten.
Die Werte sind angegeben in µmol/mg Protein.
Versuchsbedingungen wie im experimentellen Teil angegeben.
Nicotinamidkonzentration 10 mM.

M i t o c h o n d r i e n

Zeit (h)	DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
0 (Kontrolle)	1,5	2,3	3,8
1	1,6	2,4	4,o
2	1,4	2,5	3,9
3	1,7	o,4	2,1
4	o,7	o,4	1,1

" s u p e r n a t a n t "

Zeit (h)	DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
0 (Kontrolle)	3,o	1,2	4,2
1	2,4	1,8	4,2
2	2,1	1,7	3,8
3	2,o	1,6	3,6
4	o,7	1,o	1,7

Ergebnissen, die Merker, Wedell und Neubert (24) an dem gleichen Versuchsmaterial erhoben hatten: Hiernach ist bei den aus derartigen Lebern nach mehrstündiger Ischämie isolierten Mitochondrien zwar eine verminderte Atmungskettenphosphorylierung nachzuweisen, die Atmung mit DPN-abhängigen Substraten wie z.B. Glutamat oder α-Ketoglutarat ist jedoch nach 2 Stunden noch fast unverändert. Erst nach einer Ischämie von mehr als 2 Stunden sinken dann die DPN-Werte schnell ab. Auffällig ist der rasche Abfall des $DPNH+H^+$ in den Mitochondrien, dem erst später eine Veränderung der DPN^+-Konzentration nachfolgt. Da die Mitochondrienmembran für $DPNH+H^+$ offenbar ganz besonders undurchlässig ist (Lehninger, 38, und bei einer Schädigung der Mitochondrienmembran vorwiegend die oxydierte Form des Pyridinnucleotids austritt (Kaufman und Kaplan, 25), muß angenommen werden, daß primär DPN^+ aus den Zellpartikeln austritt und durch eine gleichzeitige Umwandlung von $DPNH+H^+$ in DPN^+ die Konzentration des oxydierten Pyridinnucleotids konstant gehalten wird. Der Verlust der Mitochondrien an DPN muß sicher mit einer Erhöhung der Permeabilität dieser Zellpartikel während der Ischämie und einer Schwellung erklärt werden, die sich auch elektronenmikroskopisch nachweisen läßt. Wahrscheinlich ist der Vorgang in den späten Stadien der Ischämie und Anoxie noch ausgeprägter, als es aus den in der Tabelle IX wiedergegebenen Daten hervorgeht. Wegen der starken Schwellung der Mitochondrien in den späten Stadien der Ischämie kommt es nämlich zu einem Austritt von löslichem Protein, wie in einer erheblichen Aufhellung des Matrixraumes im elektronenmikroskopischen Bild erkannt werden kann. Nach mehreren Stunden ähneln dann die Mitochondrien im Gewebeverband und im isolierten Zustand "leeren Säcken", die praktisch nur noch aus Membranen bestehen. Damit ist jedoch das Bezugssystem - bei der Beziehung auf Mitochondrien-Protein - nicht mehr verläßlich, und es werden sicher zu niedrige Proteinwerte pro Mitochondrium gemessen.

Auch Jedeikin (6) berichtet über eine auffallende Stabilität von DPN im Gewebeverband. Die Untersuchungen dieses Autors wurden jedoch bei 20° C durchgeführt. Da bekannt ist, daß eine Erniedrigung der Temperatur zu einer deutlichen Stabilisierung der Gewebe führt, wurden ähnliche Ischämie-Versuche wie die eben beschriebenen auch bei 5° C und bei einer Umgebungstemperatur von 22° C durchgeführt. Im Gegensatz zu der Versuchsserie bei 37° C wurde bei diesen Versuchen so vorgegangen, daß die Lebern in den Tieren, die sich in einem temperaturkonstanten Raum befanden, belassen wurden.

Da die Voruntersuchungen ergeben hatten, daß die DPN-Werte bei einer Nicotinamidkonzentration von 1 mM regelmäßig höher lagen als bei 10 mM, wurde diese Versuchsserie mit einer Nicotinamidkonzentration von 1 mM im Aufbereitungsmedium durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle X zusammengestellt.

Wie erwartet, führt die erniedrigte Umgebungstemperatur zu einer deutlichen Stabilisierung der Pyridinnucleotide im Gewebe. Noch nach mehreren Stunden sind Werte zu messen, die von den normalen kaum abweichen.

Diese Untersuchungen lassen die Notwendigkeit einer schnellen Unterbrechung aller enzymatischen Vorgänge bei der Bestimmung des Gesamt-DPN-Gehaltes der Leber - z.B. mit flüssiger Luft - als zweifelhaft erscheinen. Jedenfalls bestehen keine Anhaltespunkte dafür, daß sich der Gehalt an Gesamt-DPN in der Leber innerhalb von Minuten nach dem Tode oder nach dem Einsetzen einer Ischämie oder Anoxie in vivo ändert.

Diese Befunde und besonders die Ergebnisse der Versuche, die bei einer niedrigen Umgebungstemperatur durchgeführt werden, lassen es durchaus im Bereiche der Möglichkeit erscheinen, auch post mortem

Tabelle X

Ischämie bei 22° C und 5° C Umgebungstemperatur.
DPN-Gehalt in Mitochondrien der Rattenleber.
Zusammenstellung von Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten unter Normalbedingungen.
Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert von 3 Ratten.
Die Werte sind angegeben in µmol/mg Protein.
Versuchsbedingungen wie im experimentellen Teil angegeben.
Nicotinamid-Konzentration 1 mM.

M i t o c h o n d r i e n

Ischämie bei 22° C

Zeit (h)	DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
0 (Kontrolle)	1,4	3,1	4,5
2	3,o	o,6	3,6
	1,3	1,1	2,4
3	1,4	o,9	2,3
	o,7	o,8	1,5
6	1,o	o,5	1,5
12	o,3	1,2	1,5
16	o,3	1,2	1,5
24	o,4	o,6	1,o
	o,2	o,2	o,4

Ischämie bei 5° C

Zeit (h)	DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
0 (Kontrolle)	1,4	3,1	4,5
4	1,o	3,1	4,1
11	1,5	1,4	2,9
16	1,1	1,5	2,6
19	1,4	1,4	2,8
24	1,5	1,9	3,4
	1,9	o,9	2,8
	1,o	1,o	2,o
42	1,9	o,5	2,4
44	1,7	o,5	2,2
64	1,3	o,8	2,1

noch Untersuchungen durchzuführen. Auch im Bereiche der Humanmedizin mag eine Anwendung solcher Stoffwechseluntersuchungen post mortem möglich sein.

Auf der anderen Seite ist es bei vielen pathologischen Zuständen nach diesen Untersuchungen kaum zu erwarten, daß es zu einer Veränderung der Pyridinnucleotid-Konzentration in einem Organ innerhalb einer kurzen Zeit kommt. Dies steht im Gegensatz zu anderen Metaboliten des Stoffwechsels, wie ATP, Kreatinphosphat und anderen, von denen nachgewiesen wurde, daß die Konzentration innerhalb der Gewebe bereits Minuten nach Einsetzen z.B. einer Ischämie oder bei andersartigen Störungen dramatisch absinken kann. Das System der Pyridinnucleotide ist, verglichen mit diesen Substanzen, sehr viel träger in seiner Konzentrationsveränderung.

3. Einfluß einiger Pharmaka auf den DPN-Gehalt der verschiedenen Zellfraktionen der Leber.

Es sind aber durchaus Bedingungen bekannt, unter denen es auch zu einem relativ schnellen Absinken der Pyridinnucleotid-Konzentration in bestimmten Geweben kommen kann. Zu diesen Bedingungen gehören die Einwirkung bestimmter Pharmake wie z.B. alkylierender Substanzen und möglicherweise auch die Verhältnisse, die vorliegen, wenn es im Organismus nach Gabe bestimmter körperfremder Basen zur Bildung abnorm strukturierter Pyridinnucleotide kommt.

a. Einfluß von Stickstoff-Lost in vivo.

Zu einem besonders ausgeprägten Abfall der Pyridinnucleotid-Konzentration soll es na ch Befunden von Holzer und Mitarbeitern (29) nach der Einwirkung alkylierender Verbindungen vom Typ des Stickstoff-Losts oder der Äthylenimine kommen. Dieser Befund ist inzwischen von vielen anderen Autoren bestätigt worden. Besonders aus-

geprägt sind diese Verminderungen der DPN-Konzentration im Tumorgewebe. Ein großer Teil der untersuchten Verbindungen aus dieser Stoffklasse stellt daher auch Cytostatika dar. Über die Lokalisation dieses DPN-Abfalls innerhalb der Zelle liegt nur eine kurze Mitteilung vor. So fand Borst (26), daß der Gehalt der ganzen Zelle an DPN - untersucht wurde nur die oxydierte Form - wesentlich vermindert erscheint, zur gleichen Zeit in der Mitochondrien-Fraktion jedoch praktisch unveränderte Mengen des oxydierten Pyridinnucleotids nachgewiesen werden können.

Da diese alkylierenden Verbindungen nicht nur für Tumorgewebe toxisch sind, sondern ganz offensichtlich auch an normalen Geweben eine Wirkung entfalten, war es von Interesse, ob eine analoge Verminderung des DPN-Gehaltes auch in normalen Geweben nach Gabe toxischer Dosen dieser Pharmaka beobachtet werden kann. Hierbei sollte besonders geprüft werden, ob auch im Falle normaler Gewebe eine Verminderung der DPN-Konzentration nur das "compartment" des Hyaloplasma betrifft und die Pyridinnucleotid-Menge in den Mitochondrien unverändert bleibt.

Die Untersuchungen wurden nach Gabe letaler Dosen von Stickstoff-Lost (27) durchgeführt. Es wurden zwei Reihen von Versuchen ausgeführt: einmal Experimente, in denen eine relativ geringe Dosis gegeben wurde, die erst nach mehreren Tagen zu schweren Vergiftungserscheinungen und zum Tode führt, und zum anderen eine Versuchsreihe mit einer Dosis, die bereits nach 4 bis 6 Stunden schwerste Vergiftungserscheinungen hervorruft. Während Borst (26) bei Tumorzellen einen DPN^+-Abfall überwiegend bei der Bestimmung des Gehaltes der ganzen Zelle, kaum jedoch bei der Untersuchung von Mitochondrien fand, zeigen eigene Untersuchungen an der Rattenleber eher umgekehrte Verhältnisse. Wie aus den Werten der Tabelle XI

Tabelle XI

DPN-Gehalt in Mitochondrien und "supernatant" der Rattenleber nach i.p.-Gabe von 5 mg/kg Stickstoff-Lost. Zusammenstellung von Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert von 3 Ratten. Die Werte sind angegeben in mμmol/mg Protein. Versuchsbedingungen wie im experimentellen Teil angegeben. Nicotinamidkonzentration im Aufbereitungsmedium 10 mM.

M i t o c h o n d r i e n

Zeit (h)	DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
0 (Kontrolle)	1,5	2,o	3,5
52	1,1	1,4	2,5
72	1,6	o,9	2,5

" s u p e r n a t a n t "

Zeit (h)	DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
0 (Kontrolle)	3,o	1,2	4,2
52	5,3	1,o	6,3
72	2,9	o,8	3,8

Tabelle XIII

DPN-Gehalt in Mitochondrien und "supernatant" der Rattenleber nach o.p.-Gabe von 25 mg/kg Stickstoff-Lost (fünffache LD_{100}). Zusammenstellung der Untersuchungen 5 Stunden nach Injektion. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert von 3 Ratten. Die Werte sind angegeben in µmol/mg Protein. Versuchsbedingungen wie im experimentellen Teil angegeben. Nicotinamid-Konzentration im Aufbereitungsmedium 10 mM.

M i t o ch o n d r i e n

Zeit (h)	DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
0 (Kontrolle)	1,5	2,o	3,5
5	1,5	1,9	3,4
	1,1	1,2	2,3

" s u p e r n a t a n t "

Zeit (h)	DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
0 (Kontrolle)	3,o	1,2	4,2
5	3,o	1,1	4,1
	2,3	o,7	3,o

Diese Befunde sind bemerkenswert, da sich die Tiere nach dieser fünffachen LD_{100} in einem Zustand schwerster Vergiftung befanden, mit Durchfall, klebrigem, nassem Fell und starkem Zittern.

Es wäre noch zu bemerken, daß die Leber möglicherweise nicht zu den gegenüber alkylierenden Verbindungen besonders empfindlichen Organen zu zählen ist. Auch gegenüber einer Röntgenbestrahlung ist sie, verglichen mit anderen Organen wie Milz und Darm, nur relativ wenig empfindlich.

Die Untersuchungen zeigen jedoch, daß es nach einer Vergiftung in den verschiedenen Geweben durchaus nicht zu gleichartigen Veränderungen kommen muß, und daß Schlüsse, die an einem Organ unter der Einwirkung eines Pharmakons gewonnen wurden, nur in begrenztem Umfang auf andere Organe übertragen werden können.

b. Einfluß von Tetrachlorkohlenstoff in vivo.

Eine weitere toxische Substanz, von der bekannt ist, daß sie unter geeigneten Versuchsbedingungen zu Veränderungen des DPN-Gehaltes in der Leber führen kann, ist Tetrachlorkohlenstoff. Dies haben die Untersuchungen von Christie und Judah (34), Dianzani (35) u.a. gezeigt. Auch in diesem Fall ist jedoch noch nicht untersucht worden, in welchem Kompartment der Zelle sich die Veränderungen bevorzugt abspielen. Die hier beschriebenen Untersuchungen wurden mit hohen Dosen Tetrachlorkohlenstoff durchgeführt, da bekannt ist, daß nach geringeren Dosen enzymatische Veränderungen bevorzugt im endoplasmatischen Retikulum und nicht so sehr im Mitochondrien-System nachweisbar werden (Neubert und Maibauer (36)). Aus den in der Tabelle XIV aufgeführten Ergebnissen geht hervor, daß mit Tetrachlorkohlenstoff ein ähnliches Phänomen ausgelöst werden kann, wie es nach Gabe von

Tabelle XIV

DPN-Gehalt in Mitochondrien und "superantant" der Rattenleber nach s.c.-Gabe von 0,3 mg/kg CCl_4.
Bestimmung 16 1/2 Stunden nach Injektion.
Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert von 3 Ratten.
Die Werte sind angegeben in µmol/mg Protein.
Versuchsbedingungen wie im experimentellen Teil angegeben.
Nicotinamidkonzentration 10 mM.

M i t o c h o n d r i e n

Zeit (h)	DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
0 (Kontrolle)	1,5	2,0	3,5
16 1/2	1,1	1,1	2,2

" s u p e r n a t a n t "

Zeit (h)	DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
0 (Kontrolle)	3,0	1,2	4,2
16 1/2	5,2	1,1	6,3

Stickstoff-Lost beobachtet wurde. Auch bei der Vergiftung mit Tetrachlorkohlenstoff kann ein Stadium ermittelt werden, in dem die DPN-Konzentration in den Mitochondrien deutlich vermindert ist, während es in der Hyaloplasma-Fraktion zu einem entsprechenden Anstieg der DPN-Komponenten kommt. Auch hier liegt also anscheinend wieder eine erhöhte Permeabilität der Mitochondrien vor, und das DPN scheint "herauszulaufen". Interessanterweise betrifft die Veränderung auch in diesem Fall bevorzugt die reduzierte Form des DPN, obgleich dies die Form darstellt, von der bekannt ist, daß sie besonders schlecht die Mitochondrienmembran durchdringen kann. Es wäre auch in diesem Fall denkbar, daß das DPN^+ auf Kosten des $DPNH+H^+$ aufgefüllt wird. Die Parallele mit dem nach Stick - stoff-Lost beobachteten Bild ist insofern auch weiterhin vorhanden, als in den späteren Stadien der Vergiftung auch im Fall der Tetrachlorkohlenstoff-Vergiftung ein Abfall des DPN in der gesamten Zelle beobachtet wird. Siehe hierzu die Tabellen XV und XVI.

Eigenartigerweise konnte also mit keinem der beiden benutzten Pharmaka eine Veränderung hervorgerufen werden, die der bei Tumorzellen nach Gabe von alkylierenden Substanzen beschriebenen entspricht, nämlich eine Verminderung des Hyaloplasma-DPN bei erhaltenem Mitochondrien-DPN. Die Untersuchungen zeigen, daß unter geeigneten Bedingungen alle Verschiebungen des DPN-Gehaltes prinzipiell möglich sind: Eine selektive Verminderung des Hyaloplasma-DPN bei Tumorzellen nach Gabe alkylierender Substanzen, eine selektive Verminderung des Mitochondrien-DPN der Leber nach Gabe geeigneter Dosen Stickstoff-Lost oder Tetrachlorkohlenstoff, und eine Verminderung in beiden Kompartments in den späten Stadien der Vergiftungmit den beiden erwähnten Substanzen.

Tabelle XV

DPN-Gehalt in Mitochondrien und "supernatant" der Rattenleber nach s.c.-Gabe von 0,5 mg/kg CCl_4.
Bestimmung 15 Stunden nach Injektion.
Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert von 3 Ratten.
Die Werte sind angegeben in µmol/mg Protein.
Versuchsbedingungen wie im experimentellen Teil angegeben.
Nicotinamidkonzentration 10 mM.

M i t o c h o n d r i e n

Zeit (h)	DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
0 (Kontrolle)	1,5	2,o	3,5
15	1,2	o,4	1,6

" s u p e r n a t a n t "

Zeit (h)	DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
0 (Kontrolle)	3,o	1,2	4,2
15	1,5	o,7	2,2

Tabelle XVI

DPN-Gehalt in Mitochondrien und "supernatant" der Rattenleber nach zweimaliger s.c.-Gabe von o,3 mg/kg CCl_4 im Abstand von 15 Stunden. Bestimmung 40 Stunden nach der ersten Injektion. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert von 3 Ratten. Die Werte sind angegeben in µmol/mg Protein. Versuchsbedingungen wie im experimentellen Teil angegeben. Nicotinamidkonzentration im Aufbereitungsmedium 10 mM.

M i t o c h o n d r i e n

Zeit (h)	DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
0 (Kontrolle)	1,5	2,o	3,5
40	1,2	1,1	2,3

" s u p e r n a t a n t "

Zeit (h)	DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
0 (Kontrolle)	3,o	1,2	4,2
40	2,1	o,6	2,7

c. Einfluß von Nicotinamid in vivo.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Pharmaka, die eine Verminderung des DPN-Gehaltes verursachen, wird im folgenden eine Versuchsserie beschrieben, in der eine starke Erhöhung des DPN-Gehaltes der Zelle auftritt.

Bereits durch die Arbeiten von Bosch und Harper (21), Greengard (23), Kaplan (28) und vielen anderen Autoren ist bekannt, daß es nach Gabe von 500 mg/kg Nicotinamid bei Ratten zu einem Anstieg des DPN-Gehaltes kommt, der in der Leber besonders stark ausgeprägt ist, jedoch auch in anderen Organen, wie z.B. dem Gehirn nachweisbar ist. Auch im Falle dieses Pharmakons ist bisher nicht untersucht worden, in welcher Zellfraktion sich diese Veränderung vorwiegend abspielt, oder ob überhaupt ein Kompartment bei dieser DPN-Vermehrung bevorzugt wird. Es erschien daher lohnend, eine Aufschlüsselung des DPN-Gehaltes unter derartigen Versuchsbedingungen vorzunehmen, da über die Synthese von DPN in den einzelnen Zellorganellen bisher recht wenig bekannt ist.

Tabelle XVII zeigt die Ergebnisse einer Versuchsserie, die mit einer Nicotinamid-Konzentration von 1 mM im Isolierungsmedium durchgeführt wurde. Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufes des DPN-Anstiegs in den einzelnen Zellfraktionen zeigt, daß die Erhöhung des DPN besonders die Hyaloplasma-Fraktion betrifft und auch hier wieder überwiegend auf die oxydierte Form des DPN beschränkt ist. In den Mitochondrien istnur etwa eine Verdopplung des DPN-Gehaltes zu erkennen, während in dem Hyaloplasma auf dem Höhepunkt der Wirkung eine Versehnfachung des DPN-Gehaltes beobachtet werden kann.

Tabelle XVII

DPN-Gehalt in Mitochondrien und "supernatant" der Rattenleber nach i.p.-Gabe von 500 mg/kg Nicotinamid. Zusammenstellung von Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert von 3 Ratten. Die Werte sind angegeben in µmol/mg Protein. Versuchsbedingungen wie im experimentellen Teil angegeben. Nicotinamid-Konzentration im Aufbereitungsmedium 1 mM.

	Mitochondrien			"supernatant		
Zeit (h)	DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe	DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
0	1,4	3,1	4,5	0,2	0,6	0,8
2	2,4	3,6	6,0	15,2	2,1	17,3
4	2,8	3,5	6,3	21,3	2,7	24,0
8	2,7	3,3	6,0	31,0	3,0	34,0
10	3,0	3,0	6,0	27,0	3,0	30,0
12	3,6	4,0	7,6	27,0	3,8	30,8
14	3,0	3,3	6,3	34,5	3,4	37,9
16	2,7	3,7	6,4	30,0	3,2	33,2
18	2,1	3,2	5,3	20,3	3,1	23,4
22	1,7	2,1	3,8	10,2	---	----

In Untersuchungen, die mit den gleichen Versuchstieren parallel von Schulz (37) für das TPN (oxydiert und reduziert) in den Mitochondrien und in der Hyaloplasma-Fraktion durchgeführt wurden, zeigte sich, daß sich das TPN völlig anders verhält: Zunächst einmal ist der Anstieg im Falle des TPN lange nicht so ausgeprägt, wie es in den eigenen Untersuchungen bei den gleichen Tieren für das DPN gefunden wurde. Eigenartigerweise steigt nach Gabe von Nicotinamid jedoch nicht nur die oxydierte Form des TPN an - wie im Falle des DPN - sondern ganz überwiegend die reduzierte Form des TPN. Dieser Befund ist bisher nicht beschrieben worden, da die meisten Untersucher nur das DPN und vor allem die oxydierten Formen bestimmt haben. Ein weiterer Unterschied besteht darin, daß im Falle des TPN der Anstieg sich annähernd gleichmäßig auf die Mitochondrien- und auf die Hyaloplasma-Fraktion erstreckt.

In der Tabelle XVIII ist eine weitere Versuchsserie aufgeführt, die zur Kontrolle mit 10mM Nicotinamid im Isolierungsmedium durchgeführt wurde. Diese Serie bestätigt die mit 1 mM erhaltenen Resultate vollkommen. Offenbar reicht nach der Gabe von Nicotinamid in vivo die hohe Nicotinamid-Konzentration innerhalb der Zelle aus, um die Nucleosidase auch nach dem Homogenisieren weitgehend zu hemmen.

Es ergibt sich die Frage, ob die Erhöhung der DPN-Konzentration in der Mitochondrien-Fraktion nach Gabe von Nicotinamid wirklich einen Effekt der Nicotinamid-Gabe darstellt. Es wäre nämlich denkbar, daß dieser relativ geringgradige Anstieg durch "anhaftendes" DPN aus der Hyaloplasma-Fraktion mit ihren auf das Zehnfache erhöhten Werten vorgetäuscht wird. Dies ist jedoch nicht der Fall, wie weitere Untersuchungen gezeigt haben. Auch nach mehrmaligem

Tabelle XVIII

DPN-Gehalt in Mitochondrien und "supernatant" der Rattenleber nach i.p.-Gabe von 500 mg/kg Nicotinamid. Zusammenstellung von Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert von 3 Ratten. Die Werte sind angegeben in µmol/mg Protein. Versuchsbedingungen wie im experimentellen Teil angegeben. Nicotinamid-Konzentration im Aufbereitungsmedium 10 mM.

Zeit (h)	Mitochondrien			"supernatant"		
	DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe	DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
0	1,5	2,o	3,5	3,o	1,2	4,2
6 1/2	2,3	2,1	4,4	2o,o	3,4	23,4
12	2,5	2,9	5,4	31,7	3,9	35,6
14 1/2	1,6	2,3	3,9	22,5	2,7	25,2
22 1/2	1,5	3,o	4,5	2,4	1,2	3,6

"Waschen" der Mitochondrien zum Zeitpunkt des Maximums nach Nicotinamid-Gabe deutlich auf etwa das Doppelte des Normalwertes erhöht.

Das durchaus verschiedene Verhalten der DPN- und der TPN-Fraktion nach der Applikation von Nicotinamid in vivo zeigt jedenfalls, daß offenbar recht komplexe Verhältnisse bei der Synthese dieser Pyridinnucleotide innerhalb der Zelle und in dem Ausgleich der Konzentrationen in den verschiedenen Kompartments der Zelle vorliegen.

d. Untersuchungen nach mehrfacher Gabe von Nicotinamid.

Es tauchte weiterhin die Frage auf, ob es wohl möglich ist, durch mehrfache Gabe von Nicotinamid die Konzentration an DPN in der Hyaloplasma-Fraktion lange erhöht zu halten und so einen Ausgleich auch innerhalb der Mitochondrienfraktion zu erzwingen. So wurde Ratten im Abstand von ca. 12 Stunden - das entspricht etwa dem Maximum des DPN-Anstiegs - eine erneute Gabe von Nicotinamid gegeben, bis zu einem Zeitraum von 48 Stunden. Ganz überraschend ergab sich, daß die Konzentration von DPN in der Hyaloplasma-Fraktion unter diesen Versuchsbedingungen nicht wesentlich länger erhöht war, als es nach Gabe einer einzigen Dosis Nicotinamid der Fall war. Es kommt ganz offenbar zu einer "Erschöpfung" irgendeines der DPN-synthetisierenden Systeme. Diese Versuchsanordnung war jedenfalls nicht geeignet, über eine außerordentlich lange Zeit eine erhöhte DPN-Konzentration aufrecht zu erhalten und deshalb auch nicht zur Klärung der eingangs gestellten Frage geeignet.

Da zu erwarten ist, daß die Nicotinamid-Konzentration in den Geweben auch noch nach 48 Stunden recht hoch ist, muß man annehmen, daß der Abfall trotz erneuter Nicotinamid-Gabe nicht auf einer

Aktivierung der DPN-Nucleosidase beruhen kann. Dieses Ferment sollte bei den hohen Nicotinamid-Konzentrationen nach wie vor gehemmt sein. Dies würde bedeuten, daß der Abfall auf einer Verminderung der DPN-Synthese beruhen müßte. Weiterhin müßte man annehmen, daß es trotz der hohen Nicotinamidkonzentration in den Geweben zu einem Abbau von DPN kommt. Möglicherweise existieren also noch andere Wege zum Abbau von DPN als der über die DPN-Nucleosidase.

Es kann zur Zeit nicht entschieden werden, welcher Schritt in der DPN-Synthese unter diesen Versuchsbedingungen der limitierende ist und welche Zwisch enverbindungen erschöpft sind. Es erscheint jedoch mit Hilfe dieser Versuchsanordnung möglich, derartige Fragen der DPN-Synthese näher zu untersuchen. Die Zugänglichkeit radioaktiver Zwischenstufen dürfte derartige Untersuchungen heute durchaus möglich erscheinen lassen.

e. Versuche mit einer Kombination von Nicotinamid und Reserpin.

Eine Verlängerung des Nicotinamid-Effektes auf den DPN-Gehalt kann auch durch gleichzeitige Gabe bestimmten Psychopharmaka wie Reserpin oder Phenothiazine erreicht werden (Burton et al.(41) - Burton (42) - Brown (43) - Bonasera et al.(44) - Coper (45). Dabei wird die maximale Höhe des DPN-Gehaltes nur unwesentlich verändert. Die meisten derartigen Untersuchungen sind mit Ratten- G e h i r n durchgeführt worden; ein entsprechender Effekt ist aber auch an den Nucleotiden der Leber nachzuweisen.

Die Ergebnisse von Versuchen, die mit einer Kombination von Nicotinamid und Reserpin durchgeführt wurden, sind in der Tab. XIX zusammengestellt. Nach einer Gabe von 10 mg/kg Reserpin i.p. befanden sich die Tiere 4 Stunden später in einem apathischen Zustande.

Tabelle XIX

DPN-Gehalt in Mitochondrien und "supernatant" der Rattenleber nach kombinierter Gabe von 10 mg/kg Reserpin i.p. und 4 Stunden später 500 mg/kg Nicotinamid i.p.
Zusammenstellung von Untersuchungen 28 und 44 Stunden nach der Reserpin-Gabe. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert von 3 Ratten.
Die Werte sind angegeben in µmol/mg Protein.
Versuchsbedingungen wie im experimentellen Teil angegeben.
Nicotinamid-Konzentration im Aufbereitungsmedium 10 mM.

M i t o c h o n d r i e n

Zeit (h)		DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
0 (Kontrolle)	Reserpin-Gabe	1,5	2,o	3,5
4	Nicotinamid-Gabe			
28		3,5	1,4	4,9
44		2,2	1,5	3,7

" s u p e r n a t a n t "

Zeit (h)		DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
0 (Kontro lle)	Reserpin-Gabe	3,o	1,2	4,2
4	Nicotinamid-Gabe			
28		7,o	1,4	8,4
44		3,5	o,8	4,3

Zu diesem Zeitpunkt wurde ihnen 500 mg/kg Nicotinamid i.p. injiziert. Bei der Bestimmung des DPN-Gehaltes in den Mitochondrien und im Hyaloplasma ergaben sich noch nach 24 Stunden deutlich erhöhte Werte. Erst 40 Stunden nach der Nicotinamid-Gabe hatten sich alle Werte wieder normalisiert.

f. Versuche, den Anstieg des DPN-Gehaltes nach Gabe von Nicotinamid durch 6- Aminonicotinamid zu beeinflussen.

Bei dem durch Nicotinamid-Gabe verursachten Anstieg des DPN-Gehaltes handelt es sich wahrscheinlich mindestens zu einem Teile um einen Synthese-Vorgang. Es war daher von Interesse, den Einfluß eines Antimetaboliten des Nicotinamids, nämlich des 6- Aminonicotinamid, auf diesen Vorgang zu untersuchen. Es wäre denkbar, daß es bei der gleichzeitigen Gabe von Nicotinamid und 6- Aminonicotinamid zu einer Konkurrenz zwischen dem natürlichen Stoffwechselprodukt und dem Antimetaboliten kommt, und so eine Hemmung der DPN-Synthese resultiert.

Tabelle XX zeigt, daß der Anstieg des DPN-Gehaltes nach Gabe von Nicotinamid tatsächlich durch eine vorherige Gabe von 6- Aminonicotinamid vermindert werden kann. Es ist jedoch zu bedenken, daß außerordentlich hohe Dosen des Antimetaboliten zur Erzielung eines solchen Effektes notwendig waren (100 mg/kg). Zum Zeitpunkt der Untersuchung (also 18 Stunden nach Gabe des 6-AN) befanden sich die Versuchstiere in einem sehr schlechten Zustand mit Bauchlage, Lähmungen der Extremitäten und beginnenden Durchfällen. Um so erstaunlicher ist es, daß die DPN-Synthese - wenn der Anstieg des DPN im Cytoplasma eine solche widerspiegelt - noch in einem hohen Prozentsatz funktioniert. So steigt der DPN-Gehalt im Hyaloplasma statt von 4 auf 36 unter dem Einfluß des 6- Aminonicotinamid bei den schwer geschädigten Tieren immer noch von 4 µmole Gesamt-DPN/mg Protein auf 23. Auch die Tatsache, daß der DPN-Gehalt in der

Tabelle XX

DPN-Gehalt in Mitochondrien und "supernatant" der Rattenleber nach kombinierter Gabe von 100 mg/kg 6-Amino-Nicotinamid i.p. und 6 Stunden später 500 mg:kg Nicotinamid i.p.. Vergleichende Zusammenstellung der Untersuchungen 12 Stunden nach der Nicotinamid-Gabe, einmal mit vorheriger Gabe von 6-Amino-Nicotinamid (6 Std. vorher), einmal ohne.
Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert von 3 Ratten.
Die Werte sind angegeben in µmol/mg Protein.
Versuchsbedingungen wie im experimentellen Teil angegeben.
Nicotinamid-Konzentration im Aufbereitungsmedium 10 mM.

M i t o c h o n d r i e n

Zeit (h)	DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
0 (Kontrolle)	1,5	2,o	3,5
12 Std. nach Nicotinamid-Gabe	2,5	2,9	5,4
(12 Std. nach Nicotinamid-Gabe) (18 Std. nach 6-Amino-Nicotinamid-Gabe)	1,5	2,5	4,o

" s u p e r n a t a n t "

Zeit (h)	DPN^+	$DPNH+H^+$	Summe
0 (Kontrolle)	3,o	1,2	4,2
12 Std. nach Nicotinamid-Gabe	31,7	3,9	35,6
(12 Std.nach Nicotinamid-Gabe) (18 Std.nach 6-Amino-Nicotinamit-Gabe)	2o,4	2,5	22,9

Leber nach einer Vergiftung mit 6- Aminonicotinamid lange Zeit annähernd konstant bleibt (Hoehne, unveröff.-Neuhoff et al.) spricht für eine nur geringgradige Schädigung der DPN-Synthese unter diesen Versuchsbedingungen.

Die hier mitgeteilten Ergebnisse zeigen, daß es bei pharmakologischen Untersuchungen durchaus von Vorteil sein kann, nicht nur den DPN-Gehalt des gesamten Gewebes zu untersuchen, sondern auch eine Aufschlüsselung in die verschiedenen "Kompartments" vorzunehmen. Dies ist nach den hier vorliegenden Ergebnissen mindestens für Lebergewebe methodisch durchaus möglich. Prinzipiell ähnliche Verhältnisse dürften bei der Auftrennung von Nierengewebe und bei einigen experimentellen Tumoren vorliegen. Allerdings ist hier zunächst das Verhältnis, das Mitochondrien oder Mikrosomen am Gesamtanteil der Zelle ausmachen, nicht mit der gleichen Genauigkeit bekannt wie bei der Leberzelle. Auch die Tatsache, daß innerhalb eines Gewebes mehrere, funktionell völlig verschiedene, Zelltypen vorkommen, erschwert eine entsprechende Untersuchung bei Nierengewebe erheblich. Noch ungünstiger dürften in dieser Beziehung die Verhältnisse bei Gehirngewebe liegen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit war es nicht möglich, alle diese Fragen erschöpfend zu untersuchen und zu beantworten. Es ging vielmehr um die prinzipielle Klärung dieser Fragestellung.

Über entsprechende Veränderungen im TPN-Gehalt von Leberzellen unter dem Einfluß einiger Pharmaka hat H.-U.-Schulz in unserem Institut Untersuchungen durchgeführt. Interessanterweise besteht in vieler Beziehung k e i n e Parallelität im Verhalten des oxydierten und reduzierten Anteils dieses Co-Faktors verglichen mit dem DPN.

D. Zusammenfassung.

1. Es wurde eine neue Methode entwickelt (modifiz. nach Klingenberg) zur Extraktion und Bestimmung des DPN aus der Rattenleber.

2. Aus demselben Tiermaterial wurde DPN^+ und $DPNH+H^+$ gleichzeitig in den verschiedenen Zellfraktionen bestimmt. Bei der Verwendung verschiedener Nicotinamid-Konzentrationen im Aufbereitungsmedium ergab sich, daß für die Bestimmung des DPN-Gehaltes in den Mitochondrien eine Nicotinamid-Konzentration von 1mM am günstigsten ist, für das "supernatant" eine Nicotinamid-Konzentration von 10 mM. Eine gleichzeitige optimale Bestimmung in Mitochondrien und "supernatant" ist also nicht möglich. Die Ergebnisse liegen im Durchschnitt höher als die bisher veröffentlichten.

3. Der Einfluß einer über verschieden la nge Zeiträume andauernden Ischämie bei 37° C, 22° C und 5° C Umgebungstemperatur auf den DPN-Gehalt der Rattenleber wurde untersucht. Hierbei ist auffällig, daß der DPN-Gehalt bei einer Ischämie bis zu 2 Stunden bei 37° C kaum verändert ist. Besondere Schnellstop-Verfahren scheinen si ch also zu erübrigen, solange die Zellen intakt sind. Die DPN-Konzentration sinkt erst, wenn einmal die Zellstruktur zerstört ist, und zum anderen das DPN vorwiegend im oxydierten Zustand vorliegt, wie es z.B. bei Substratmangel der Fall ist. Niedrigere Umgebu ngstemperaturen zögern die Zerstörung des DPN noch länger hinaus, bei 5° C Umgebungstemperatur z.B.ist noch 64 Stunden post mortem etwa die Hälfte des ursprünglich vorhandenen DPN-Gehaltes in den Mitochondrien zu fi nden.

4. Hohe Dosen alkylierender Substanzen wie Stickstoff-Lost vermindern den DPN-Gehalt in den Mitochondrien von Rattenlebern, erhöhen ihn aber im Hyaloplasma. Durch Permeabilitätsänderungen der Mitochondrienmembran "läuft das DPN aus den Mitochondrien heraus". Erst in späten Vergiftungsstadien nach mehrfacher LD_{100} sinkt die DPN-Konzentration in der ganzen Zelle allgemein ab.

5. Die Veränderungen im DPN-Gehalt nach Tetrachlorkohlenstoff-Gabe laufen parallel zu denen nach Stickstoff-Lost. Auch hier sinkt in den anfänglichen Vergiftungsstadien der DPN-Gehalt in den Mitochondrien, während er entsprechend im Hyaloplasma ansteigt. In späten Vergiftungsstadien findet auch beim Tetrachlorkohlenstoff ein allgemeines Absinken des DPN-Gehaltes in der ganzen Zelle statt.

6. Der DPN-Gehalt der Zelle steigt nach in-vivo-Gabe von Nicotinamid. Das Maximum in der Leber liegt ca. 12 Stunden nach der Injektion. Der Anstieg betrifft vorwiegend das DPN^+ im Hyaloplasma, das bis auf ca. das Zehnfache erhöht wird; in den Mitochondrien steigt der DPN-Gehalt immerhin aufs Doppelte. Nach in-vivo-Applikation von Nicotinamid spielt die Nicotinamid-Konzentration im Aufbereitungsmedium keine Rolle mehr. Die Konzentration im Gewebe reicht aus zur Hemmung der Nucleosidase. Mehrfache in-vivo-Gaben von Nicotinamid vermögen nicht, den DPN-Spiegel wesentlich länger hoch zu halten als eine einfache Gabe. Es kommt offenbar zu einer Erschöpfung eines der DPN-synthetisierenden Systeme.

7. Auch durch vorherige Gabe von Reserpin kann der Anstieg des DPN-Gehaltes nach Nicotinamid verlängert werden. Auch diese Verlängerung betrifft vor allem den Vorgang im Hyaloplasma.

8. Der DPN-Anstieg nach Nicotinamid-Gabe kann durch vorherige Gabe des Antimetaboliten 6-Amino-Nicotinamid teilweise gehemmt werden.

Literaturverzeichnis.

1. B.J. Jandorf
   The Stability of Diphosphopyridine Nucleotide in Rat Tissues
   J. Biol. Chem. 150, 89 (1943).

2. C.B. Anfinsen
   A Micromanometric Method for the Determination of Diphospho-
   pyridine Nucleotide
   J. Biol. Chem. 152, 285 (1944).

3. F.M. Huennekens and D.E. Green
   Studies on the Cyclophorase System.
   The Requirement for Pyridine Nucleotide.
   Archives of Biochemistry 27, 418 (1950).

4. H. Holzer, St. Goldschmidt, W. Lamprecht und E. Helmreich
   Bestimmung stationärer Zwischenstoffkonzentrationen. I.
   Z. physiol. Chem., Hoppe-Seyler's, 297 (1954) I.

5. G.E. Glock and P. McLean
   The Determination of Oxidized and Reduced Diphosphopyridine
   Nucleotide and Triphophopyridine Nucleotide in Animal Tissues
   Biochem. J. 61, 381 (1955).

6. L.A. Jedeikin and S. Weinhouse
   Metabolism of Neoplastic Tissue. Assay of Oxidized and Reduced
   Diphosphopyridine Nucleotide in Normal and Neoplastic Tissues
   J. Biol. Chem. 213, 271 (1955).

7. G.E. Glock and P. McLean
   The Intracellular Distribution of Pyridine Nucleotides in
   Rat Liver
   Exp. Cell. Res. 11, 234 (1956).

8. K.B. Jacobson and N.O. Kaplan
   Pyridine Coenzymes of Subcellular Tissues Fractions
   J. Biol. Chem. 226, 603 (1957).

9. F.A. Holton, W.C. Hülsmann, D.K. Myers and E.C. Slater
A. Comparison of the Properties of Mitochondria Isolated from Liver and Heart
Biochem. J. 67, 579 (1957).

9a. J.A. Bassham, L.M. Birt, R. Hems and U.E. Loening
Determination of the Reduced and Oxidized Pyridine Nucleotides in Animal Tissues
Biochem. J. 73, 491 (1959).

1o. M. Klingenberg, W. Slenczka und E. Ritt
Vergleichende Biochemie der Pyridinnucleotidsysteme in Mitochondrien verschiedener Organe
Bioch. Z. 332, 47 (1959).

11. J.L. Purvis
Pyridine Nucleotides in Rat-Liver Mitochondria
Biochim. Biophys. Acta 38, 435 (196o).

12. L.M. Birt and W. Bartley
The Distribution and Metabolism of Intra- and Extra-Mitochondrial-Pyridine Nucleotides in Suspensions of Liver Mitochondria
Biochem. J. 75, 303 (1960).

13. E.C. Slater, Bailie and Bouman
Pyridine Nucleotides in Mitochondria
Biol. Struct. and Funct., vol.II, 2o7 - Acad. Press (1961).

14. M. Klingenberg
Struktur und funktionelle Biochemie der Mitochondrien
Funktionelle und Morphologische Organisation der Zelle
Springer-Verlag, 1963, S. 69

15. P. Borst
Hydrogen Transport and Transport Metabolites
Funktionelle und Morphologische Organisation der Zelle
Springer-Verlag, 1963, S. 137

16. O.H. Lowry, J.V. Passonneau, D.W. Schulz and M.K. Rock
The Measurement of Pyridine Nucleotides by Enzymatic Cycling
J. Biol. Chem. 236, 2746 (1961).

33. A.L. Greenbaum, J.B. Clark and P. McLean
The Estimation of the Oxidized and Reduced Forms of the Nicotinamide Nucleotide
Biochem. J. 95, 161 (1965).

34. G.S. Christie and J.D. Judah
Mechanism of action of carbon tetrachloride on liver cells
Proc. Roy. Soc. B. 142, 241 (1954).

35. M.V. Dianzani
Uncoupling of oxidative phosphorylation in mitochondria from fatty livers
Biochim. Biophys. Acta 14, 514 (1954).

36. D. Neubert und Maibauer
Vergleichende Untersuchungen der oxydativen Leistungen von Mitochondrien und Mikrosomen bei experimenteller Leberschädigung
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak. 235, 291 (1959).

37. H.-U. Schulz
Unveröffentlichte Befunde.

38. A.L. Lehninger
Phosphorylation coupled to oxidation of $DPNH_2$
J. Biol. Chem. 190, 345 (1951).

39. L. Garcia-Bunuel, D.B. McDougal,Jr., H.B. Burch, E.M. Jones and E. Touhill
Oxidized and Reduced Pyridine Nucleotide Levels and Enzyme Activities in Brain and Liver of Niacin deficient Rats.
Journal of Neurochemistry, 1962, Vol.9, 589 - Pergamon Press Ltd.

40. V. Neuhoff und C. Desselberger
Bestimmung und Stabilität von Pyridinnucleotiden in Organextrakten
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path. Pharmak. 252, 43 (1965).

41. R.M.Burton, N.O.Kaplan, A.Goldin, M.Leitenberg and S.R.Humphreys
Interaction of Nicotinamide with Reserpine and Chlorpromazine
III.Some affects on the diphosphopyridine nucleotide content in liver
Arch. int. pharmacodyn. 1960, CXXVIII, No. 3-4, S. 260.

42. R.M. Burton
Alteration of Tissue Pyridine Nucleotide Levels and the Central Nervous System
in "Inhibitions of the Nervous System and -Aminobutyric Acid"
Pergamon Press, 1960.

43. F.C. Brown
Nicotinamide Adenine Dinucleotide Levels in Rat Brain
Canadian Journal of Biochemistry, Vol. 42 (1964), 489.

44. M. Bonasera, G. Mangione and V. Bonavita
Diphosphopyridine Nucleotide Synthesis in Brain following Injection of various Compounds.
Biochemical Pharmacology, 1963, Vol.12, 633, Pergamon Press

45. H. Ceper
Der Gehalt an NAD, NADP und Nicotinsä ureamid im Gehirn von Ratten nach Einwirkung zentral wirksamer Pharmaka
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp.Path. Pharmak. 244, 42o (1963).

Herrn Prof. Dr. med. Hans Herken und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Diether Neubert möchte ich an dieser Stelle für die freundliche und großzügige Unterstützung dieser Arbeit meinen besonderen Dank ausdrücken.

L e b e n s l a u f .

Am 12. Februar 1939 wurde ich als zweiter Sohn des Augenarztes Dr. Hermann H o e h n e und seiner Frau Elisabeth, geb. Witt, in Hamburg geboren.

Nach einer Grundschulzeit von 4 1/2 Jahren besuchte ich ab Ostern 1949 das humanistische Gymnasium "Christianeum" in Hamburg-Othmarschen, an dem ich Ostern 1957 das Abitur machte. Während der nächsten zwei Jahre absolvierte ich eine kaufmännische Lehre mit Abschlußexamen vor der Handelskammer Hamburg.

Im Sommersemester 1959 begann ich mein Medizinstudium in Freiburg i.Brg. und ging nach bestandenem Physikum für zwei Semester nach Wien. Die letzten vier klinischen Semester studierte ich an der Freien Universität Berlin. Dort bestand ich im März 1965 das Staatsexamen. Seitdem war ich als Medizinalassistent 5 Monate auf der chirurgischen Abteilung des Ev. Krankenhauses Hubertus, Berlin 38, und 6 Monate auf der Inneren Abteilung des Allgemeinen Krankenhauses Altona, Hamburg 50, tätig.